



⑫

DEMANDE DE BREVET EUROPEEN

⑬ Numéro de dépôt : 92401456.6

⑬ Int. Cl.⁵ : C12Q 1/70, C12Q 1/68,
C07H 21/00, C12P 19/34,
C12N 15/48

⑭ Date de dépôt : 27.05.92

⑮ Priorité : 31.05.91 FR 9106579

⑯ Inventeur : Sauvalgo, Sylvie
28 rue Emile Gueymard
F-38000 Grenoble (FR)
Inventeur : Fouque, Brigitte
3 avenue Aristide Bergès
F-38170 Seyssinet (FR)

⑯ Date de publication de la demande :
02.12.92 Bulletin 92/49

⑰ Mandataire : Orès, Bernard et al
Cabinet ORES 6, Avenue de Messine
F-75008 Paris (FR)

⑯ Etats contractants désignés :
BE CH DE ES FR GB IT LI

⑯ Demandeur : CIS BIO INTERNATIONAL
RN 306
F-91400 Sacay (FR)

⑭ Oligonucléotides, utilisables comme réactifs pour la détection *in vitro* des infections à rétrovirus de type HIV et procédé de détection de rétrovirus de type HIV.

⑭ Oligonucléotides, utilisables comme réactifs pour la détection *in vitro* des infections à rétrovirus de type HIV (HIV-1 et/ou HIV-2) et procédé de détection de rétrovirus de type HIV.

Ces oligonucléotides, comprennent environ 25 à 35 nucléotides et sont constitués par une séquence homologue d'un gène commun à tous les virus de type HIV, et plus particulièrement par une séquence homologue issue des gènes *pol*, *tat* et *gag* des virus HIV-1 BRU, HIV-1 ARV HIV-1 HXB2, HIV-1 BH5, HIV-1 ELI, HIV-1 NDK, HIV-1 MAL et HIV-1 SF2 et HIV-2 ROD et les séquences complémentaires de ces séquences, lesquelles séquences sont choisies parmi :

1) les séquences homologues issues du gène *tat* des HIV, qui correspondent :

— aux positions 5419-5446, 5447-5474, 5533-5560, 5563-5590 du génome du virus HIV-1 BRU et
— aux positions 8311-8338, 8363-8390, 8426-8453, 8480-8507 du génome du virus HIV-2 ROD (GenBank, n° M15390) ;

2) les séquences homologues issues du gène *pol* des HIV, qui correspondent :

— aux positions 3208-3235, 3436-3463, 3647-3675, 3739-3766 du génome du virus HIV-1 BRU et
— aux positions 3141-3168, 3241-3268, 3651-3678, 3693-3720 du génome du virus HIV-2 ROD (GenBank, n° M15390) ;

3) les séquences homologues issues du gène *gag* dans HIV-1 et qui correspondent aux positions 882-909, 949-976, 1047-1074 et 1177-1204 du génome du virus HIV-1 BRU.

La présente invention est relative à des oligonucléotides, utilisables comme réactifs pour la détection *in vitro* des infections à rétrovirus de type HIV (HIV-1 et/ou HIV-2).

L'isolement et la caractérisation du rétrovirus de type HIV-1 a été décrit dans la Demande de Brevet européen n° 138 667 et le rétrovirus de type HIV-2 a été décrit dans la Demande de Brevet européen n° 239 425.

Ces deux rétrovirus ont pour cibles préférentielles les lymphocytes T4 humains et présentent un effet cytopathogène à l'égard de ces lymphocytes, qui entraîne une lymphadénopathie ou un syndrome d'immunodéficience acquise (SIDA) et des nombreuses infections opportunistes associées.

Ces deux virus présentent une homologie de 60 % sur l'ensemble de l'acide nucléique des gènes gag et pol et de 30-40 % pour les autres gènes viraux et le LTR.

Le diagnostic et/ou la détection fiable des rétrovirus de type HIV est important, notamment pour suivre les individus à haut risque et aussi pour essayer de prévenir la transmission de la maladie.

Les tests de diagnostic sérologiques ou immunologiques de l'infection à virus de type HIV se fondent principalement sur la détection des anticorps par des méthodes immunoenzymatiques s'appuyant sur la technique ELISA. Ces techniques mettent en évidence des marqueurs indirects de l'infection au virus HIV et ne fournissent donc pas de résultats interprétables (faux négatifs notamment), dans les cas où une détection précoce est nécessaire, en particulier dans le cas des enfants nés de mères séropositives ou dans le cas des individus à haut risque, avant une séroconversion, par exemple.

Des détections directes, qui peuvent être interprétables précocement, ont été préconisées ; on peut citer notamment le dépistage d'antigènes circulants ou encore l'isolement du virus à partir des lymphocytes d'un patient ; toutefois cette approche n'est pas adaptée à une utilisation en routine, notamment dans des laboratoires d'analyse médicale.

C'est pourquoi d'autres tests ont été développés, et associent notamment la détection du génome HIV par hybridation moléculaire, à une technique d'amplification génomique.

La Demande de Brevet français 2 647 810, aux noms de l'INSTITUT PASTEUR et de l'INSERM, décrit des amores oligonucléotidiques comprenant une vingtaine de bases pour l'amplification du génome des rétrovirus du type HIV-2 et SIV et leurs applications au diagnostic *in vitro* des infections dues à ces virus. Cette Demande décrit plus particulièrement une série de couples d'amores qui sont choisies de manière à ce que les fragments d'ADN synthétisés couvrent les régions P₁ à P₂, LTR₁ à pol₂, P₂ à P₇, P₇ à P₈ et P₈ à LTR₂ desdits virus.

La Demande de Brevet français 2 652 091, aux noms de l'INSTITUT PASTEUR et de l'INSERM, décrit des séquences nucléotidiques issues du génome des rétrovirus du type HIV-1, HIV-2 et SIV et leurs applications notamment en tant qu'amores pour l'amplification des génomes de ces rétrovirus et pour le diagnostic *in vitro* des infections dues à ces virus. Les oligonucléotides de cette Demande sont notamment comprises dans une séquence commune aux génomes des virus HIV-1, HIV-2 et SIV située dans les gènes gag, vpr et pol.

Cependant comme le précise cette Demande, ainsi que J.J. SNINSKY et S. KWOK [Detection of human immunodeficiency viruses by the polymerase chain reaction, (Arch. Path. Lab. Med., 1990, 114, 259-262)], le choix des amores est crucial pour obtenir une bonne sensibilité et un bon rendement de l'amplification ; en effet, la sensibilité de la PCR (amplification par réaction de polymérisation en chaîne) dépend de la spécificité avec laquelle les amores initient la polymérisation de l'acide nucléique, à partir de la séquence cible, par rapport à des régions non spécifiques de l'acide nucléique.

D'autres facteurs peuvent également intervenir dans la sensibilité de la méthode d'amplification :

- les variations de concentration en enzyme, amores et cations métalliques (MgCl₂) peuvent notamment avoir un effet important sur le rendement en produit de la PCR ;
- la longueur des amores, les températures et les temps d'hybridation, ainsi que les étapes d'extension de l'acide nucléique de chaque cycle peuvent également affecter la sensibilité et la spécificité des amplifications.

Il ressort de ces différents documents qu'une amplification sensible et présentant un bon rendement doit combiner des réactifs très spécifiques (amores) et un protocole d'amplification particulièrement bien adapté.

Les différentes méthodes énumérées ci-dessus présentent un certain nombre d'inconvénients :

- le test immunologique manque de sensibilité, ceci étant sans doute dû à l'infection latente et/ou à la séquestration de l'antigène viral dans des immuns complexes circulants ;
- l'hybridation *in situ* et l'analyse par Southern blot ont été utilisées, avec un succès sporadique en raison du faible nombre de cellules mononucléaires infectées du sang périphérique ;
- l'utilisation de l'amplification a amélioré la sensibilité du test de détection des virus HIV ; toutefois les amores décrites aussi bien dans les Demandes Pasteur et al. précitées que dans l'article paru dans J. Infect. Dis., en 1988 (158, 6, 1170-1176), au nom de M. RAYFIELD et al., (amores et sondes, sélectionnées au niveau du gène gag (p24)) ont l'inconvénient :

- de présenter des réactions croisées (séquences communes),
- de ne pas fournir de rendements suffisants pour la détection de très petites quantités de virus,
- de ne pas permettre une discrimination poussée entre les infections à HIV-1 et à HIV-2, ou
- de ne pas détecter tous les variants de HIV connus ou inconnus dans la mesure où dans les conditions drastiques d'hybridation préconisées, ces amores, d'une longueur d'une vingtaine de bases, ont été sélectionnées de façon à obtenir 100 % d'homologie avec la cible et ne permettent pas ou peu l'hybridation avec les acides nucléiques de HIV ayant subi des modifications de séquence (mutations par exemple).

La présente invention s'est en conséquence donné pour but de fournir des réactifs de diagnostic (amorces et sondes), qui répondent mieux aux nécessités de la pratique que les réactifs proposés dans l'Art antérieur, notamment en ce que lesdits réactifs permettent l'obtention de rendements importants en séquences cibles, s'hybrident notamment avec des régions hautement conservées des HIV, tout en étant insensibles aux variations du génome de ces virus et en permettant une discrimination fine des HIV-1 et des HIV-2.

15 La présente invention a pour objet des oligonucléotides, comprenant environ 25 à 35 nucléotides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par une séquence homologue d'un gène commun à tous les virus de type HIV, et plus particulièrement par une séquence homologue issue des gènes *pol*, *tat* et *gag* des virus HIV-1 BRU, HIV-1 ARV, HIV-1 HXB2, HIV-1 BH5, HIV-1 ELI, HIV-1 NDK, HIV-1 MAL, HIV-1 SF2 et HIV-2 ROD et les séquences complémentaires de ces séquences, lesquelles séquences sont choisies parmi :

les séquences complémentaires de ces séquences, et, par conséquent, les séquences homologues issues du gène *tat* des HIV, qui correspondent :

- 1) les séquences homologues issues du gène *tat* des HIV, qui correspondent :
 - aux positions 5419-5446, 5447-5474, 5533-5560, 5563-5590 du génome du virus HIV-1 BRU et
 - aux positions 8311-8338, 8363-8390, 8426-8453, 8480-8507 du génome du virus HIV-2 ROD (GenBank, n° M15390) ;
- 2) les séquences homologues issues du gène *pol* des HIV, qui correspondent :
 - aux positions 3208-3235, 3436-3463, 3647-3675, 3739-3766 du génome du virus HIV-1 BRU et
 - aux positions 3141-3168, 3241-3268, 3651-3678, 3693-3720 du génome du virus HIV-2 ROD (GenBank, n° M15390) ;
- 3) les séquences homologues issues du gène *gag* dans HIV-1 et qui correspondent aux positions 882-900, 949-976, 1047-1074 et 1177-1204 du génome du virus HIV-1 BRU.

909, 949-976, 1047-1074 et 1177-1204 du génome du virus HIV-1 BNU.
Au sens de la présente invention, "séquence homologue" englobe non seulement les séquences identiques ou complémentaires aux fragments de gène sus-mentionnés, mais également celles n'en différant que par la substitution, la délétion ou l'addition d'un petit nombre de nucléotides, à condition que les séquences ainsi modifiées aient une spécificité d'hybridation équivalente à celle des oligonucléotides décrits ci-dessus.

35 De même, on entend par "séquence complémentaire", non seulement les séquences strictement complémentaires des fragments de gène conformes à l'invention, mais également des séquences modifiées comme indiqué précédemment, possédant une spécificité d'hybridation équivalente à celle desdites séquences strictement complémentaires.

On définit notamment, dans la présente invention, les conditions d'hybridation comme suit : KCl 50mM, Tris HCl pH 8,3 10mM, MgCl₂, 2,5mM, gélatine, 0,1 mg/ml, en présence de 20 à 50 pmoles de chacun des oligonucléotide conforme à l'invention.

de chacun des oligonucléotides conforme à l'invention. Les oligonucléotides conformes à l'invention, d'une longueur supérieure à 25 bases, ont l'avantage :
- de s'hybrider et de permettre la PCR avec la séquence HIV convenable même si celle-ci a subi plusieurs mutations,
- de permettre d'effectuer les amplifications dans des conditions peu drastiques, ce qui permet aux oligonucléotides conformes à l'invention de détecter tous les variants tout en restant spécifiques de l'espèce recherchée,
- d'augmenter ainsi l'éventail des souches d'HIV détectables, tout en restant spécifiques.

tes :

5

(1) 5' CAG TAG ATC CTA GAC TAG AGC CCT GGA A
 (2) 5' GCA TCC AGG AAG TCA GCC TAG GAC TGC T
 (3) 5' TTC CTG CCA TAG GAG ATG CCT AAG GCT T
 (4) 5' TGA GGA GGT CTT CGT CGC TGT CTC CGC T
 (5) 5' TGC CCA CAC TAA TGA TGT AAA ACA ATT A
 10 (6) 5' AGG AGC AGA AAC TTT CTA TGT AGA TGG G
 (7) 5' ATT CAC TTT TAT CTG GTT GTG CTT GAA T
 (8) 5' ATT TCC TCC AAT TCC TTT GTG TGC TGG T
 (9) 5' ATA TCC ACA AGG ACC GGG GAC AGC CAG C
 15 (10) 5' TGG AAG CAA CGG TGG AGA CAG ATA CTG G
 (11) 5' TAG TCT GGT CAA GAG GCG AAT CAG CTG G
 (12) 5' GAT GAG TTG GAG GGT CAG GAA GCT CCT G
 (13) 5' TCA ATG ACA TCC AGA AGC TAG TGG GTG T
 20 (14) 5' GAC ACT CAC AGA AGA AGT ACA GTG GAC A
 (15) 5' ATA GGA TCC CCT ACC AGG TTA AAC GCT A
 (16) 5' CTA TTG CAG GAT CCA TCT GTG TAG AAG G
 25
 (17) 5' GAT TTA AAC ACC ATG CTA AAC ACA GTG G
 (18) 5' TCA ATG AGG AAG CTG CAG AAT GGG ATA G
 30 (19) 5' TTT GTT CCT GAA GGG TAC TAG TAG TTC C
 (20) 5' TTT GGT CCC TGT CTT ATG TCC AAA ATG C

35 Les oligonucléotides (1) à (8) s'hybrident spécifiquement avec l'HIV-1 et peuvent notamment être modifiés, de manière à présenter le minimum d'homologie avec les séquences correspondantes du virus HIV-2 ROD.

Les oligonucléotides (9) à (16) s'hybrident spécifiquement avec l'HIV-2 et peuvent notamment être modifiés, de manière à présenter le minimum d'homologie avec les séquences correspondantes de l'HIV-1 BRU.

Les oligonucléotides (17) à (20) s'hybrident spécifiquement avec l'HIV-1.

La présente invention a également pour objet un réactif de diagnostic pour la détection d'au moins un rétrovirus de type HIV (HIV-1 et/ou HIV-2), caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide conforme à l'invention, éventuellement marqué de manière appropriée.

40 Selon un mode de réalisation avantageux dudit réactif, il correspond à des paires d'amorces pour la synthèse d'un fragment nucléique d'HIV.

Conformément à ce mode de réalisation, ledit réactif est notamment constitué par l'une des paires d'amorces suivantes :

45 . paire A : oligonucléotide (1) et oligonucléotide (4),
 . paire B : oligonucléotide (5) et oligonucléotide (8),
 . paire C : oligonucléotide (9) et oligonucléotide (12),
 . paire D : oligonucléotide (13) et oligonucléotide (16),
 . paire E : oligonucléotide (2) et oligonucléotide (3),
 50 . paire F : oligonucléotide (6) et oligonucléotide (7),
 . paire G : oligonucléotide (10) et oligonucléotide (11),
 . paire H : oligonucléotide (14) et oligonucléotide (15),
 . paire I : oligonucléotide (17) et oligonucléotide (20),
 . paire J : oligonucléotide (18) et oligonucléotide (19).

55 Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit réactif, il correspond à une sonde de détection ou de révélation d'un fragment nucléique d'HIV et est marqué de manière convenable.

On peut citer, à titre d'exemple, comme marqueurs convenables, les isotopes radioactifs, les enzymes appropriées, les fluorochromes ou les marqueurs chimiques appropriés et les haptènes, les anticorps, ou les ana-

logues de base.

En effet, de tels oligonucléotides peuvent être utilisés soit comme amorce, soit comme sonde, dans une méthode d'hybridation ou dans une méthode d'amplification convenable [technique PCR (Demande européenne CETUS n°201 184) ; technique dite de la Q β replicase (Biotechnol., 1988, 6, 1197) ; technique à la T7 ARN-polymérase (Demande internationale PCT WO89/01050)] et également dans celle décrite dans la Demande Internationale PCT/FR90/00410.

5 Les oligonucléotides conformes à l'invention ont l'avantage :

- d'être spécifiques des virus du type HIV-1 et/ou HIV-2,
- d'être insensibles aux variations génomiques de ces virus, et
- 10 - de permettre une discrimination poussée et simultanée (marqueurs distincts, longueur des séquences cibles obtenues, par exemple) entre les infections dues à des virus HIV-1 et celles dues à des virus HIV-2.

La présente invention a également pour objet un procédé de détection d'un virus HIV par la détection de sa séquence d'acide nucléique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend, après une mise en solution appropriée de l'échantillon biologique pour extraire l'acide nucléique :

15 A. une étape dans laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un réactif de diagnostic choisi dans le groupe qui comprend les réactifs conformes à l'invention et tout autre réactif apte à s'hybrider avec la séquence à détecter, et

20 B. une étape dans laquelle on détecte par tout moyen approprié le/les produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique d'HIV éventuellement présente-réactif de diagnostic.

25 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé le réactif de diagnostic de l'étape A est choisi dans le groupe qui comprend les paires d'amorces dont au moins l'une d'entre elles est un oligonucléotide conforme à l'invention et les paires d'amorces convenables pour l'amplification de la séquence nucléotidique d'HIV c'est-à-dire apte à s'hybrider avec la séquence à amplifier, lequel procédé permet l'obtention du produit d'amplification de la séquence nucléotidique à détecter.

30 Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, les produits d'amplification obtenus en A sont détectés par hybridation entre lesdits produits d'amplification et un réactif de diagnostic conforme à l'invention, marqué de manière appropriée.

35 Selon un autre mode de mise en oeuvre dudit procédé, le réactif de diagnostic de l'étape A est une sonde de détection ou de révélation conforme à l'invention et permet l'obtention d'hybrides entre la séquence nucléotidique à détecter et ladite sonde.

En variante, lorsque le procédé conforme à l'invention met en oeuvre une technique d'amplification génomique desdits virus au cours de l'étape A précitée, celui-ci comprend :

- (1) comme étape A, une étape d'enrichissement en séquence(s) cible(s) par :
 - 35 (a) mise en contact de l'échantillon biologique mis en solution, avec au moins une paire d'amorces appropriées, pour amplifier au moins un fragment de ladite séquence d'acide nucléique cible, lesdites amorces s'hybrideront à ladite séquence cible et permettant d'obtenir une solution d'enrichissement ; et
 - (b) au moins une dilution appropriée de la solution d'amplification d'enrichissement obtenue en (a) ;
- (2) et une étape B de détection des séquences cibles amplifiées obtenues, par :
 - 40 (c) mise en contact d'une fraction de la solution d'enrichissement obtenue en (b) avec au moins une paire d'amorces dont au moins l'une des séquences est incluse dans la séquence cible amplifiée en (a) ; et
 - (d) détection des copies d'acide nucléique cible double brin obtenues en (c), par tout moyen approprié, lequel procédé est caractérisé en ce qu'on met en oeuvre, pour l'étape (a), au moins un oligonucléotide conforme à l'invention, apparié avec un oligonucléotide choisi dans le groupe qui comprend les oligonucléotides conformes à l'invention et tout autre oligonucléotide apte à s'hybrider avec lesdites séquences cibles et pour l'étape (c), une paire d'oligonucléotides (amorces) choisis dans le groupe qui comprend les oligonucléotides conformes à l'invention dont la séquence est homologue ou complémentaire de la séquence cible amplifiée en (a) et tout autre oligonucléotide apte à s'hybrider avec les séquences cibles obtenues en (a).

50 Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, les paires d'amorces sont sélectionnées, de préférence, parmi les paires suivantes :

- . paire A : oligonucléotide (1) et oligonucléotide (4),
- . paire B : oligonucléotide (5) et oligonucléotide (8),
- . paire C : oligonucléotide (9) et oligonucléotide (12),
- . paire D : oligonucléotide (13) et oligonucléotide (16),
- . paire E : oligonucléotide (2) et oligonucléotide (3),
- . paire F : oligonucléotide (6) et oligonucléotide (7),

- . paire G : oligonucléotide (10) et oligonucléotide (11),
- . paire H : oligonucléotide (14) et oligonucléotide (15),
- . paire I : oligonucléotide (17) et oligonucléotide (20),
- . paire J : oligonucléotide (18) et oligonucléotide (19).

5 La paire d'amorces A permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-1 située sur le gène *tat*, d'une longueur de 171 bases, délimitée par les nucléotides 5419-5500 du génome du virus HIV-1.

La paire d'amorces B permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-1 située sur le gène *pol*, d'une longueur de 559 bases, délimitée par les nucléotides 3208 et 3766 du génome du virus HIV-1.

10 La paire d'amorces C permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-2 située sur le gène *tat*, d'une longueur de 197 bases, délimitée par les nucléotides 8311 et 8507 du génome du virus HIV-2.

La paire d'amorces D permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-2 située sur le gène *pol*, d'une longueur de 581 bases, délimitée par les nucléotides 3141-3720 du génome du virus HIV-2.

La paire d'amorces E permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-1 située sur le gène *tat*, d'une longueur de 114 bases, délimitée par les nucléotides 5447-5560 du génome du virus HIV-1.

15 La paire d'amorces F permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-1 située sur le gène *pol*, d'une longueur de 240 bases, délimitée par les nucléotides 3436 et 3675 du génome du virus HIV-1.

La paire d'amorces G permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-2 située sur le gène *tat*, d'une longueur de 91 bases, délimitée par les nucléotides 8363 et 8453 du génome du virus HIV-2.

20 La paire d'amorces H permet d'obtenir une séquence cible d'HIV-2 située sur le gène *pol*, d'une longueur de 430 bases, délimitée par les nucléotides 3241-3678 du génome du virus HIV-2.

La paire d'amorces I permet d'obtenir une séquence cible HIV-1 située sur le gène *gag*, d'une longueur de 323 bases, délimitée par les nucléotides 882 et 1204 sur le génome du virus HIV-1.

La paire d'amorces J permet d'obtenir une séquence cible HIV-1 située sur le gène *gag*, d'une longueur de 126 bases, et délimitée par les nucléotides 949 et 1074 sur le génome du virus HIV-1.

25 Selon une disposition avantageuse de ce mode de réalisation, les paires d'amorces de l'étape (a) et les paires d'amorces de l'étape (c) sont de préférence associées selon les groupements suivants :

groupe 1 : paire A - paire E

groupe 2 : paire B - paire F

groupe 3 : paire C - paire G

30 groupe 4 : paire D - paire H

groupe 5 : paire I - paire J

Egalement conformément à l'invention, les paires d'amorces de l'étape (c) sont des paires : amorce modifiée par un système de capture-amorce modifiée par un système de détection.

35 On entend par amorce de capture (Ac), une séquence d'acide nucléique simple brin modifiée notamment par au moins une moitié de paire d'affinité et qui s'hybride à une séquence cible ; par exemple, à une extrémité de la chaîne oligonucléotidique une ou plusieurs biotines peuvent être fixées. L'amorce de capture peut également être un oligonucléotide branché.

40 On entend par amorce de détection (Ad), une séquence d'acide nucléique simple brin modifiée par un système de détection et qui s'hybride à une séquence cible ; par exemple, l'oligonucléotide peut être marqué en son extrémité 5' par du phosphore 32 et/ou de l'iode 125.

45 Ce procédé de détection a été dénommé "AMPLICIS"® par les inventeurs.

La présente invention a de plus pour objet un kit de détection d'un virus HIV, caractérisé en ce qu'il comprend outre les tampons et réactifs appropriés à l'hybridation, à la détection, et éventuellement à l'amplification, au moins un réactif conforme à l'invention.

50 Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions qui ressortiront de la description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en œuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

55 Exemple 1: Détection de HIV-1 tat dans des prélevements sanguins.

1) Protocole opératoire

55 Les échantillons de sang total sont lysés selon le protocole préconisé par R. HIGUCHI (PCR Technology 1989, H. ERLICH Ed, p. 36, Stockton Press, NY).

25 µl de lysats sanguins sont amplifiés dans un volume de 100 µl de tampon (KCl 50mM, Tris HCl pH 8,3 10mM, MgCl₂ 2,5mM, gélatine 0,1 mg/ml, nonidet NP40 0,45 %, Tween 20 0,45 %), en présence de 20 pmoles

de chacune des amores externes et de 2,5 unités de Taq DNA polymérase. On effectue une première dénaturation à 94°C pendant 10 minutes, puis 35 cycles d'amplification (dénaturation 94°C 1 minute, hybridation 55°C 1 minute et élongation 72°C 2 minutes). Une dernière incubation de 8 minutes à 72°C permet de terminer les élongations.

5 Après dilution au 1/200, une partie aliquote (2 µl) de chaque amplification primaire diluée est prélevée et réamplifiée dans un volume total de 25 µl contenant 2,5 pmoles de chaque amorce interne modifiée (l'une avec un résidu biotine, la deuxième avec un iodé radioactif ¹²⁵I). L'amplification de détection se poursuit sur 25 cycles (dénaturation 94°C 1 minute, hybridation 55°C 1 minute, élongation 72°C 1 minute). Le produit d'amplification final est fixé par le résidu biotine sur un tube préalablement recouvert avec de l'avidine, et après élimination 10 des amores en excès par lavages, le tube est compté dans un compteur γ .

2) Résultats

15 - Le tableau I suivant montre une première série de résultats obtenus avec huit lysats sanguins et quatre témoins négatifs.

TABLEAU I

Activité totale par tube : 150 000 cpm

20	témoin	1	7092
25	échantillon	1	30267
		2	33769
30		3	221
		4	36154
35	témoin	2	612
		5	15190
40	échantillon	6	13574
		7	15360
45	témoin	8	34311
		3	1205
		4	3627

40 Ces résultats ont été comparés aux analyses sur gel et hybridations obtenues à partir des amplifications primaires. On note une très bonne corrélation entre les deux types de détection.

Les échantillons 1, 2, 4, 5, 6, 7 et 8 ont montré bande d'amplification spécifique sur gel après amplification primaire. L'échantillon 3 et les témoins étaient négatifs. Ces résultats se retrouvent de manière identique avec le procédé conforme à l'invention.

- Autre série de résultats de détection des séquences tat de HIV-1 :

45 La première PCR est réalisée sur 1 µg d'ADN extrait de cellules contrôle, de lymphocytes ou de monocytes de patients.

La deuxième PCR est réalisée après une dilution au 1/200 du produit d'amplification de la première PCR. L'amplification est mesurée après 16 ou 32 cycles de PCR II.

50 Les résultats obtenus avec deux patients (patient A : séropositif-asymptomatique ; patient B : séropositif-SIDA-traitement à l'AZT), sont résumés dans le Tableau II ci-après :

TABLEAU II

Fixation (cpm)

Echantillon	16 cycles	32 cycles
monocytes A	13 455	56 344
lymphocytes A	56 424	65 916
monocytes B	1 166	5 302
lymphocytes B	64 766	70 782
contrôle - (1)	1 657	1 611
contrôle + (2)	67 426	68 252

15 (1) U937

(2) p8T1-LAV

La présence de séquences HIV-1 rares dans les monocytes du patient B peuvent être détectés après 32 cycles d'amplification.

20 **Exemple 2: Détection de HIV-1 *pol* dans des prélevements sanguins.**

Une détection du fragment *pol* est effectuée sur les prélevements étudiés avec *tat*, selon un protocole identique à celui décrit à l'exemple 1. Seule différence : les amores spécifiques du fragment *pol*.

Les résultats obtenus sont illustrés dans le tableau III ci-après :

TABLEAU III

Activité totale par tube : 160 000 cpm

T1	112	E5	6178
E1	1982	E6	112
E2	2854	E7	1305
E3	10454	E8	11582
E4	6986	T3	115
T2	124	T4	99

40 Ces résultats montrent aussi une bonne corrélation avec le Southern et l'hybridation.

45

50

55

Exemple 3 : Comparaison de la méthode de détection avec les réactifs de l'invention avec une procédure PCR standard (Southern blot).

TABLEAU IV

Echantillon	Southern blot			Procédé "AMPLICIS"®	
	amorces de l'Art ant. gag	amorces tat de l'inven- LTR	amorces tion env	16 cycles	32 cycles
<u>Contrôle négatif</u> : lignée U937 : cellules B	- -	- -	- -	- -	- -
Lymphocytes Patient A	+	-	+	+++	+++
Lymphocytes Patient B	+	+	+	+++	+++
Monocytes Patient A	-	-	-	+	+++
Monocytes Patient B	+	-	-	-	+
<u>Contrôle positif</u> p8T1-LAV	+++	+++	+++	+++	+++

Ce Tableau IV montre que :

- d'une part les amorces conformes à l'invention présentent une sensibilité supérieure à celle des amorces de l'Art antérieur ;
- d'autre part, l'utilisation des amorces conformes à l'invention, dans un procédé de détection par amplification du type décrit dans la Demande Internationale PCT/FR90/00410, augmente encore la sensibilité de la détection.

Exemple 4: Détection simultanée d'HIV-1/HIV-2.

On a recherché la présence des séquences pol des virus HIV-1 et HIV-2 comme précisé à l'exemple 2 ci-dessus dans les lignées CEM infectées par les cellules BRU, NDK et ROD.

	HIV-1 pol (cpm)	HIV-2 pol (cpm)
BRU	7 923	115
NDK	7 900	142
ROD	184	28 173
Activité totale	140 000	190 000

Le Tableau ci-dessus montre qu'il n'existe pas de réaction croisée entre HIV-1 et HIV-2.

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement à ceux de ses modes de mise en œuvre, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écartez du cadre, ni de la portée, de la présente invention.

5

Revendications

10 1°) Oligonucléotides, comprenant environ 25 à 35 nucléotides, caractérisés en ce qu'ils sont constitués par une séquence homologue d'un gène commun à tous les virus de type HIV, et plus particulièrement par une séquence homologue issue des gènes *pol*, *tat* et *gag* des virus HIV-1 BRU, HIV-1 ARV HIV-1 HXB2, HIV-1 BH5, HIV-1 ELI, HIV-1 NDK, HIV-1 MAL et HIV-1 SF2 et HIV-2 ROD et les séquences complémentaires de ces séquences, lesquelles séquences sont choisies parmi :

15 1) les séquences homologues issues du gène *tat* des HIV, qui correspondent :
 - aux positions 5419-5446, 5447-5474, 5533-5560, 5563-5590 du génome du virus HIV-1 BRU et
 - aux positions 8311-8338, 8363-8390, 8426-8453, 8480-8507 du génome du virus HIV-2 ROD (Gen-Bank, n° M15390) ;

20 2) les séquences homologues issues du gène *pol* des HIV, qui correspondent :
 - aux positions 3208-3235, 3436-3463, 3647-3675, 3739-3766 du génome du virus HIV-1 BRU et
 - aux positions 3141-3168, 3241-3268, 3651-3678, 3693-3720 du génome du virus HIV-2 ROD (Gen-Bank, n° M15390) ;

25 3) les séquences homologues issues du gène *gag* dans HIV-1 et qui correspondent aux positions 882-909, 949-976, 1047-1074 et 1177-1204 du génome du virus HIV-1 BRU.

2°) Oligonucléotides selon la revendication 1, caractérisés en ce qu'ils répondent à l'une quelconque des formules suivantes :

30 (1) 5' CAG TAG ATC CTA GAC TAG AGC CCT GGA A
 (2) 5' GCA TCC AGG AAG TCA GCC TAG GAC TGC T
 (3) 5' TTC CTG CCA TAG GAG ATG CCT AAG GCT T
 (4) 5' TGA GGA GGT CTT CGT CGC TGT CTC CGC T
 (5) 5' TGC CCA CAC TAA TGA TGT AAA ACA ATT A

35 (6) 5' AGG AGC AGA AAC TTT CTA TGT AGA TGG G
 (7) 5' ATT CAC TTT TAT CTG GTT GTG CTT GAA T
 (8) 5' ATT TCC TCC AAT TCC TTT GTG TGC TGG T
 (9) 5' ATA TCC ACA AGG ACC GGG GAC AGC CAG C
 (10) 5' TGG AAG CAA CGG TGG AGA CAG ATA CTG G
 (11) 5' TAG TCT GGT CAA GAG GCG AAT CAG CTG G
 40 (12) 5' GAT GAG TTG GAG GGT CAG GAA GCT CCT G
 (13) 5' TCA ATG ACA TCC AGA AGC TAG TGG GTG T
 (14) 5' GAC ACT CAC AGA AGA AGT ACA GTG GAC A
 (15) 5' ATA GGA TCC CCT ACC AGG TTA AAC GCT A
 (16) 5' CTA TTG CAG GAT CCA TCT GTG TAG AAG G
 (17) 5' GAT TTA AAC ACC ATG CTA AAC ACA GTG G
 (18) 5' TCA ATG AGG AAG CTG CAG AAT GGG ATA G
 (19) 5' TTT GTT CCT GAA GGG TAC TAG TAG TTC C
 55 (20) 5' TTT GGT CCC TGT CTT ATG TCC AAA ATG C

3°) Réactif de diagnostic pour la détection d'au moins un rétrovirus de type HIV (HIV-1 et/ou HIV-2), caractérisé en ce qu'il comprend au moins un oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2, éventuellement marqué de manière appropriée.

4°) Réactif selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il correspond à des paires d'amorces pour la synthèse d'un fragment nucléique d'HIV.

5 5°) Réactif selon la revendication 4, caractérisé en ce qu'il est notamment constitué par l'une des paires d'amorces suivantes :

- 10 . paire A : oligonucléotide (1) et oligonucléotide (4),
- . paire B : oligonucléotide (5) et oligonucléotide (8),
- . paire C : oligonucléotide (9) et oligonucléotide (12),
- . paire D : oligonucléotide (13) et oligonucléotide (16),
- . paire E : oligonucléotide (2) et oligonucléotide (3),
- . paire F : oligonucléotide (6) et oligonucléotide (7),
- . paire G : oligonucléotide (10) et oligonucléotide (11),
- . paire H : oligonucléotide (14) et oligonucléotide (15),
- . paire I : oligonucléotide (17) et oligonucléotide (20),
- . paire J : oligonucléotide (18) et oligonucléotide (19).

6°) Réactif selon la revendication 3, caractérisé en ce qu'il correspond à une sonde de détection ou de révélation d'un fragment nucléique d'HIV et est marqué de manière convenable.

20 7°) Procédé de détection d'un virus HIV par la détection de sa séquence d'acide nucléique dans un échantillon biologique, caractérisé en ce qu'il comprend, après une mise en solution appropriée de l'échantillon biologique pour extraire l'acide nucléique :

A. une étape dans laquelle on met en contact l'échantillon biologique avec au moins un réactif de diagnostic choisi dans le groupe qui comprend les réactifs selon l'une quelconque des revendications 3 à 6 et tout autre réactif apte à s'hybrider avec la séquence à détecter, et

25 B. une étape dans laquelle on détecte par tout moyen approprié le/s produits résultant de l'interaction séquence nucléotidique d'HIV éventuellement présente-réactif de diagnostic.

8°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le réactif de diagnostic de l'étape A est choisi dans le groupe qui comprend les paires d'amorces dont au moins l'une d'entre elles est un oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2 et les paires d'amorces convenables à l'amplification de la séquence nucléotidique d'HIV, lequel procédé permet l'obtention du produit d'amplification de la séquence nucléotidique à détecter.

30 9°) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que les produits d'amplification obtenus en A sont détectés par hybridation entre lesdits produits d'amplification et un réactif de diagnostic selon l'une quelconque des revendications 3 à 6, marqué de manière approprié.

10 10°) Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que le réactif de diagnostic de l'étape A est une sonde de détection ou de révélation selon la revendication 3 ou la revendication 6, lequel procédé permet l'obtention d'hybrides entre la séquence nucléotidique à détecter et ladite sonde.

11°) Procédé selon la revendication 7, mettant en oeuvre une technique d'amplification génomique desdits virus au cours de l'étape A précitée, lequel procédé comprend, après la mise en solution appropriée de l'échantillon biologique pour extraire l'acide nucléique, la détection de la séquence d'acide nucléique du HIV recherché à l'aide des étapes suivantes :

40 (1) comme étape A, une étape d'enrichissement en séquence(s) cible(s) par :

45 (a) mise en contact de l'échantillon biologique mis en solution, avec au moins une paire d'amorces appropriées, pour amplifier au moins un fragment de ladite séquence d'acide nucléique cible, lesdites amorces s'hybrider à ladite séquence cible et permettant d'obtenir une solution d'enrichissement ; et

(b) au moins une dilution appropriée de la solution d'amplification d'enrichissement obtenue en (a) ;

50 (2) et une étape B de détection des séquences cibles amplifiées obtenues, par :

(c) mise en contact d'une fraction de la solution d'enrichissement obtenue en (b) avec au moins une paire d'amorces dont au moins l'une des séquences est incluse dans la séquence cible amplifiée en

(a) ; et

(d) détection des copies d'acide nucléique cible double brin obtenues en (c), par tout moyen approprié,

55 lequel procédé est caractérisé en ce qu'on met en oeuvre, pour l'étape (a), au moins un oligonucléotide selon la revendication 1 ou la revendication 2, apparié avec un oligonucléotide choisi dans le groupe qui comprend les oligonucléotides selon la revendication 1 et la revendication 2 et tout autre oligonucléotide apte à s'hybrider avec lesdites séquences cibles et pour l'étape (c), une paire d'oligonucléotides (amorces) choisis dans le groupe qui comprend les réactifs selon l'une quelconque des revendications 3 à 5 dont la séquence est homologue ou complémentaire de la séquence cible amplifiée en (a) et tout autre oligonucléotide apte à

s'hybrider avec les séquences cibles obtenues en (a).

12°) Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce que les paires d'amorces sont sélectionnées, de préférence, parmi les paires suivantes :

- 5 . paire A : oligonucléotide (1) et oligonucléotide (4),
- . paire B : oligonucléotide (5) et oligonucléotide (8),
- . paire C : oligonucléotide (9) et oligonucléotide (12),
- . paire D : oligonucléotide (13) et oligonucléotide (16),
- . paire E : oligonucléotide (2) et oligonucléotide (3),
- . paire F : oligonucléotide (6) et oligonucléotide (7),
- 10 . paire G : oligonucléotide (10) et oligonucléotide (11),
- . paire H : oligonucléotide (14) et oligonucléotide (15),
- . paire I : oligonucléotide (17) et oligonucléotide (20),
- . paire J : oligonucléotide (18) et oligonucléotide (19).

13°) Procédé selon la revendication 11 ou la revendication 12, caractérisé en ce que les paires d'amorces de l'étape (a) et les paires d'amorces de l'étape (c) sont de préférence associées selon les groupements suivants :

- groupe 1 : paire A - paire E
- groupe 2 : paire B - paire F
- groupe 3 : paire C - paire G
- 20 groupe 4 : paire D - paire H
- groupe 5 : paire I - paire J

14°) Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 à 13, caractérisé en ce que les paires d'amorces de l'étape (c) sont des paires : amorce modifiée par un système de capture-amorce modifiée par un système de détection.

25 15°) Kit de détection d'un virus HIV, caractérisé en ce qu'il comprend outre les tampons et réactifs appropriés à l'hybridation, à la détection, et éventuellement à l'amplification, au moins un réactif selon l'une quelconque des revendications 3 à 6.

30

35

40

45

50

55



Office européen
des brevets

RAPPORT DE RECHERCHE EUROPEENNE

Numéro de la demande

EP 92 40 1456

DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS		Revendication concordée	CLASSEMENT DE LA DEMANDE (Int. CL.5)		
Catégorie	Citation du document avec indication, en cas de besoin, des parties pertinentes				
X	EP-A-0 370 694 (CETUS CORP.) * page 9, ligne 24; exemple 1 *	1-10, 15 11-14	C12Q1/70 C12Q1/68 C07H21/00 C12P19/34 C12N15/48		
Y					
X	EP-A-0 403 333 (INSTITUT PASTEUR)	1-10, 15			
Y	* page 3, ligne 3 - ligne 53; revendications *	11-14			
D	& FR-A-2 652 091				
A	PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA. vol. 86, Avril 1989, WASHINGTON US pages 2423 - 2427; D. J. KEMP ET AL.: 'Colorimetric detection of specific DNA segments amplified by polymerase chain reactions' * le document en entier *	1-10			
Y		11-14			
X	SCIENCE. vol. 239, 15 Janvier 1988, LANCASTER, PA US pages 295 - 297; CHIN-YIN OU ET AL.: 'DNA amplification for direct detection of HIV-1 in DNA of peripheral blood mononuclear cells' * le document en entier *	1			
X			DOMAINES TECHNIQUES RECHERCHES (Int. CL.5)		
X	EP-A-0 386 563 (BAYER) * page 7 *	1-7	C12Q		
X	EP-A-0 269 445 (CETUS CORPORATION) * exemple 2 *	1			
X	EP-A-0 272 098 (CITY OF HOPE NATIONAL MEDICAL CENTER) * colonne 2, ligne 24 - ligne 39 *	1			
P, X	EP-A-0 439 222 (EASTMAN KODAK CO.) * le document en entier *	1-15			
P, X	EP-A-0 469 610 (SHIONOGI SEIYAKU KK) * le document en entier *	1-15			
Le présent rapport a été établi pour toutes les revendications					
Numéro de la recherche	Date d'achèvement de la recherche	Examinateur			
LA HAYE	01 SEPTEMBRE 1992	MOLINA GALAN E.			
CATÉGORIE DES DOCUMENTS CITÉS					
X : particulièrement pertinent à lui seul Y : particulièrement pertinent en combinaison avec un autre document de la même catégorie A : arrête-plan technologique O : divulgation non décrite P : document intercalaire					
T : théorie ou principe à la base de l'invention E : document de brevet antérieur, mais publié à la date de dépôt ou après cette date D : cité dans la demande L : cité pour d'autres raisons A : membre de la même famille, document correspondant					